

## تکثیر گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth) با استفاده از کشت رویان

معصومه مدرس<sup>۱</sup>، پروانه ابریشم‌چی<sup>۱</sup>، حمید اجتهادی<sup>۱</sup> و علی رضوانی<sup>۱</sup>

۱- دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، مشهد، خراسان رضوی E-mail: m\_modarres70@yahoo.com

### چکیده

گیاه دارویی نوروزک (*Salvia leriifolia*) متعلق به تیره نعناع (Lamiaceae) و بومی استان خراسان و سمنان می‌باشد. در این پژوهش با توجه به درصد جوانه‌زنی بسیار کم در بذره‌های این گیاه، با استفاده از کشت رویان، تکثیر گیاه مورد بررسی قرار گرفت. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 4-D، 2 با غلظت‌های ۰، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر و کیتین (۶-فورفوریل آمینو پورین) با غلظت‌های ۰/۳، ۰/۱ و ۰ میلی‌گرم در لیتر برای رشد رویان در محیط کشت MS استفاده شدند. نمونه‌ها ابتدا یک هفته در تاریکی و دمای ۲۵°C و بعد به مدت سه هفته در شرایط روشنایی قرار گرفتند و رشد رویانها به صورت کمی و کیفی بررسی شد. براساس نتایج بدست آمده محیط 4-D، 2۲ mg l<sup>-1</sup> همراه با ۰/۱ mg l<sup>-1</sup> کیتین، به طور معنی‌داری نسبت به محیط‌های دیگر جهت افزایش باززایی و رشد رویان مناسبتر بود.

واژه‌های کلیدی: *Salvia leriifolia*، تکثیر و کشت رویان.

### مقدمه

گونه نوروزک *Salvia leriifolia* متعلق به تیره نعناع (Lamiaceae)، بومی استان خراسان و سمنان است (Rechinger 1982)، که در مناطق سرد و نیمه خشک تا سرد و خشک این استانها، در ارتفاعات بین ۹۰۰ تا ۱۶۵۰ متری، با متوسط بارندگی ۸۰ میلیمتر می‌روید. شکل خاص برگها به ویژه پرزهای سفید دو طرف برگها و حالت چرمی آن و همچنین گسترده بودن بوته گیاه روی سطح زمین موجب مقاومت گیاه در مقابل بادهای سوزان زمستان و گرمای شدید می‌شود (صفوی، ۱۳۶۸).

گزارشهای مختلفی در ارتباط با خواص درمانی گیاه نوروزک وجود دارد. برای مثال، عصاره آبی و الکلی ریشه‌های گیاه، خاصیت محافظت‌کنندگی عصبی در برابر کم‌خونی‌های موضعی در مغز موش دارد (Sadeghnia et al., 2003). فعالیت ضد درد و آرام بخش

عصاره برگ نوروزک در ۵۰۰ mg/kg قابل مقایسه با ۵mg/kg دیازپام، گزارش شده است (Hosseinzadeh & Lary, 2000). مقابله عصاره گیاه با التهاب‌های مزمن از نظر کارایی مشابه با داروی دیکلوفناک است (Hosseinzadeh & Yavary, 1999). همچنین تأثیر عصاره آبی و الکلی برگ نوروزک در جلوگیری از ایجاد و توسعه زخمهای معده در موش، مشابه با داروی سوکرافت (sucralfate) گزارش شده است (Hosseinzadeh et al., 2000). بعلاوه، نتایج حاصل از بررسی تأثیر عصاره ریشه و برگ این گیاه بر میکروبه‌های مختلف، حاکی از وجود خاصیت ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای در بخشهای مختلف گیاه می‌باشد (باغی، ۱۳۷۵؛ جبارزاده، ۱۳۷۸ و مدرس، ۱۳۸۶). برگ و ریشه گیاه نوروزک دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی بوده و از اکسیداسیون روغن آفتابگردان جلوگیری می‌کنند. این خاصیت قابل رقابت با

است. از آنجا که با جداسازی رویان از بذر، بازدارنده‌های رشد موجود در ساختارهای احاطه کننده رویان حذف می‌شوند، رویانها زودتر از موعد مقرر جوانه می‌زنند. کشت رویان ابزار مفیدی برای تکثیر گیاهانی است که با محدودیت در جوانه‌زنی مواجه هستند. همچنین کشت رویان در اصلاح و دورگ‌گیری گیاهان مفید است. گزارشهایی در مورد کشت رویان در گیاهانی مثل کتان، زنبق، سویا و سیب وجود دارد (پیری، ۱۳۷۶). در گیاه نوروزک بذرها به محض رسیدن می‌ریزند و توسط سایر موجودات مصرف می‌شوند. این گیاه تعداد زیادی بذر تولید می‌کند، ولی بسیاری از آنها قوه نامیه ندارند و برخی نیز شرایط مساعد برای جوانه‌زنی نداشته و گروهی توسط حشرات، دام و انسان خورده می‌شوند. بنابراین، حتی در شرایط مطلوب بذر گیاه با محدودیت شدید در جوانه‌زنی مواجه است و از طرف دیگر، به دلیل وجود مواد موسیلاژی در پوسته بذر به سرعت دچار آلودگیهای قارچی می‌شود (حداد خداپرست و حسینی، ۱۳۷۲). تکثیر گیاه نوروزک در شرایط آزمایشگاهی و بعد استقرار آن در محیط طبیعی و همچنین بررسی امکان کشت و پرورش آن در مناطقی به غیر از زیستگاههای طبیعی، امکان استفاده بهینه از این گیاه را به عنوان گیاه دارویی، زراعی و مرتعی فراهم خواهد کرد. نوروزک از جمله گونه‌های با ارزش مناطق کویری و بیابانی ایران محسوب می‌گردد که با توجه به گسترش وسیع آن در ارتفاعات سنگلاخی و خاکهای مارنی آهکی و سبک و همچنین مقاومت زیاد به شرایط کم آبی و درجه حرارت بالا، بسیار حائز اهمیت است. زمان رسیدگی این گونه در مناطق بیابانی نیز نشان می‌دهد که به عنوان گونه آخر فصل بهار قسمتی از علوفه دام را تأمین می‌کند (فیله کش، ۱۳۸۲). بنابراین، تلاش در جهت تکثیر این گونه می‌تواند علاوه بر زراعی نمودن آن،

آنتی‌اکسیدانهای رایج در صنایع غذایی نظیر بوتیلید هیدروکسی تولوئن (BHT) و آلفا توکوفرول می‌باشد. این ویژگی در ارتباط با حضور متابولیت ثانویه‌ای از نوع شالکونها، به نام بوتئین، در این گیاه است (Hadad Khodaparast et al., 2006 و فرهوش، ۱۳۸۲). از دیگر متابولیت‌های ثانویه با ارزش موجود در این گونه، به ترتیب فراوانی، می‌توان به ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و آلکالوئیدها اشاره کرد. در اسانس این گیاه ۱۷ نوع ترپن با درصدهای متفاوت وجود دارد. ترکیبات بورنئول (Borneol) با ۲۶٪، ایونول (Ionol) با ۱۵٪ و ۸-سینئول (Cineol) با ۹٪ بیشترین سهم را به خود اختصاص می‌دهند (طباطبائی یزدی، ۱۳۷۴). میزان پروتئین موجود در بذر حدود ۳۲٪ گزارش شده که به دلیل ویژگیهای منحصر به فرد نظیر قرابت زیاد اسید آمینه‌های آن با شیر و ضریب هضم بالا، می‌تواند در تهیه شیرخشک و فرآورده‌های گوشتی سوسیس و کالباس مورد استفاده قرار گیرد. همچنین بذر این گیاه به واسطه داشتن روغن مرغوب برای تغذیه انسان، برگ آن برای تغذیه دام و الیاف آن برای تولید دستمال کاغذی مناسب است (حداد خداپرست، ۱۳۷۴).

بررسیهای انجام شده بر روی جوانه‌زنی و تکثیر گیاه بسیار اندک است. برطبق نتایج حداد خداپرست بذر این گیاه در صفر درجه سانتیگراد شروع به جوانه‌زنی کرده و در  $8^{\circ}\text{C}$ – $4^{\circ}\text{C}$  جوانه‌زنی به حداکثر می‌رسد. درصد جوانه‌زنی در شوری صفر حداکثر بوده و با افزایش فشار اسمزی کاهش پیدا می‌کند. همچنین درصد جوانه‌زنی به شدت تحت تأثیر خشکی (پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰)، کاهش می‌یابد (حداد خداپرست و حسینی، ۱۳۷۲).

تکثیر گیاه از طریق کشت رویان، روش مفیدی برای غلبه بر خواب دانه‌ها و کوتاه کردن زمان اصلاح گیاه

رویوان در ۳۰ ظرف کشت قرار گرفتند و به سه تیمار نوری متفاوت منتقل شدند: الف) ده ظرف به مدت یک هفته در انکوباتور تاریک و دمای  $25^{\circ}\text{C}$  (ب) ده ظرف به مدت دو هفته در انکوباتور تاریک و دمای  $25^{\circ}\text{C}$  (ج) ده ظرف از ابتدا به شرایط فتوپریودی ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای  $25-28^{\circ}\text{C}$  بعد ویالهای هر سه تیمار به مدت سه هفته به شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و دمای  $25-28^{\circ}\text{C}$  منتقل شدند. در این مدت رشد رویانها هر ۲۴ ساعت یکبار از نظر کیفی (نمو رویان، طول ساقه و طول ریشه) بررسی گردید.

به منظور بررسی تأثیر تنظیم کننده‌های رشد، غلظتهای مختلف از هورمون D-2,4 (۲ و ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید) به تنهایی ( $1\text{ mg I}^{-1}$ ،  $2/5$ ،  $2$ ،  $1/5$ ،  $1$  و  $0$ ) و کینتین (۶- فورفوریل آمینو پورین) در غلظتهای ( $1\text{ mg I}^{-1}$ ،  $0/3$  و  $0/1$  و  $0$ ) به تنهایی، به محیط کشت MS اضافه شد. بعد از مشخص شدن مناسبترین غلظتهای D-2,4 برای رشد و باززایی رویان، ترکیبات مختلف از این غلظتها ( $1\text{ mg I}^{-1}$  و  $2/5$  و  $2$ ) و غلظتهای ( $1\text{ mg I}^{-1}$ ،  $0/3$  و  $0/1$  و  $0$ ) از کینتین به محیط کشت MS اضافه شد. پس از ضدعفونی کردن بذر به روش قبلی، رویان چند میلیمتری با دقت از میان دو لپه خارج شده و به صورت افقی در محیط کشت قرار گرفت. از هر تیمار ۱۲ تکرار و در هر ویال یک رویان کشت شد. محیطهای کشت به مدت یک هفته در انکوباتور در شرایط تاریکی و دمای  $25^{\circ}\text{C}$  و بعد به مدت ۳ هفته در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای  $25-28^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند. پس از گذشت ۴ هفته، تعداد رویانهای رشد یافته، طول اندام هوایی، طول ریشه و تعداد برگ، مورد ارزیابی قرار گرفت. وزن تر گیاه توسط ترازوی با دقت ۱ میلیگرم و وزن خشک آن با

سبب جلوگیری از فرسایش خاک شده و زمینه ایجاد مرتع و کویرزدایی را فراهم آورد. بنابراین، در تحقیق حاضر تلاش شد تا تکثیر گیاه از طریق کشت رویان مورد بررسی قرار گیرد.

## مواد و روشها

بذر گیاه نوروزک از منطقه برجک از توابع شهرستان بردسکن واقع در استان خراسان رضوی (طول جغرافیایی  $22^{\circ}$  و  $35^{\circ}$ ، عرض جغرافیایی  $58^{\circ}$  و  $57^{\circ}$ ، ارتفاع از سطح دریا ۱۲۹۰ متر) جمع‌آوری شد. بذرها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ و ۳ دقیقه در آب ژاول ۳٪ ضدعفونی و بعد با آب مقطر استریل شسته شدند. به منظور کشت رویان از محیط کشت MS به همراه ساکارز  $1\text{ mg I}^{-1}$ ،  $20$ ، گلیسین  $1\text{ mg I}^{-1}$ ،  $2$ ، ذغال فعال به میزان  $1\text{ mg I}^{-1}$  و آگار  $1\text{ g I}^{-1}$  استفاده شد. pH محلول، روی ۵/۸ تنظیم شد. بعد ۱۰CC از محلول به ویالهای ۱۲۰ CC دارای درب منتقل شد و به مدت ۲۰ دقیقه در  $121^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر اتوکلاو شد (پیریک، ۱۳۷۶).

برای بررسی بهترین جداکشت، قطعاتی از لپه و رویان به ترتیب به عنوان جداکشت تهیه شدند؛ رویان همراه با یک لپه، رویان همراه با نصف لپه، رویان همراه با قسمت کوچکی از یک لپه و رویان بدون لپه در هر یک از ظروف کشت، از هر جداکشت ۱ قطعه در محیط کشت MS بدون هورمون کشت شدند.

برای بررسی تأثیر شرایط نوری در رشد رویان، بذرها به ترتیب قبل در مسیر ضدعفونی قرار گرفتند، بعد در زیر ذره‌بین با اسکالپل و سوزن تشریح رویان چند میلیمتری با دقت از میان دو لپه خارج شده، به صورت افقی در سطح محیط کشت MS بدون هورمون قرار داده شد. تعداد ۳۰

ترازوی با دقت ۰/۱ میلیگرم اندازه‌گیری شد و مواردی مانند ضخیم شدن اندامها، خمیدگی برگها و پرزدار بودن آنها مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار آماری JMP انجام شد و تفاوت میانگینها توسط آزمون HSD (Tukey) در سطح اطمینان ۹۵ درصد محاسبه گردید.

## نتایج

### الف- تأثیر شرایط نوری در رشد جداکشتهای رویانی

پس از یک هفته رویانهای واجد یک لپه رشد نکردند، در حالی که ۱۰ درصد از رویانهای واجد نصف لپه، ۳۰ درصد از رویانهای کشت شده همراه با قسمت کوچکی از یک لپه باززایی شدند. بیش از ۹۶٪ از رویانهای بدون لپه رشد پیش‌رس داشته و به گیاهچه تبدیل شدند (شکل ۶- الف). از طرف دیگر، رویانهایی که از ابتدا در معرض نور و شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند رشد بسیار کندی داشتند و در نتیجه طول اندام هوایی و ریشه در آنها بسیار کوتاه بود. رویانهایی که به مدت یک هفته در تاریکی بودند، رشد کرده و پس از انتقال به نور در عرض ۲۴ ساعت سبز شده و به رشد خود ادامه دادند. رویانهایی که به مدت ۲ هفته در انکوباتور و شرایط تاریکی بودند، تبدیل به گیاهچه‌های اتیوله‌ای شدند که پس از منتقل شدن به نور پس از ۳ روز سبز شدند. اگرچه، بخش هوایی و ریشه در این گیاهان رشد خوبی داشتند، ولی حتی پس از گذشت یک ماه برگها در این گیاهان کوچک بوده و رشد زیادی نکردند (شکل ۶- ب و ج).

ب- تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D در کشت رویان  
چهار هفته بعد از کشت، در کلیه غلظت‌های 2,4-D، باززایی رویان انجام شد. تحلیل داده‌های حاصل از اندازه‌گیری طول بخش هوایی نشان داد که طول بخش هوایی گیاهان باززایی شده در غلظت‌های  $2 \text{ mg l}^{-1}$  و  $2/5$  هورمون به‌طور معنی‌داری بیشتر از محیط بدون هورمون بود. در حالی که در دیگر غلظت‌ها، تفاوت معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد. بیشترین طول بخش هوایی در غلظت هورمونی  $2 \text{ mg l}^{-1}$  بدست آمد که با غلظت  $2/5$  تفاوت معنی‌داری نداشت. از طرف دیگر، طول ریشه در غلظت‌های  $5 \text{ mg l}^{-1}$ ،  $2/2$  و  $3$  تفاوت معنی‌داری با شاهد داشت. بیشترین طول ریشه در غلظت‌های  $3 \text{ mg l}^{-1}$  مشاهده شد که با غلظت‌های  $2 \text{ mg l}^{-1}$  و  $2/5$  تفاوت معنی‌داری نداشت؛ در حالی که با دیگر غلظت‌ها از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۱ و شکل ۱). بیشترین تعداد برگ در غلظت  $2 \text{ mg l}^{-1}$  هورمون بدست آمد، گرچه از نظر آماری با دیگر غلظت‌ها و شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱ و شکل ۲). بیشترین وزن تر مربوط به غلظت هورمونی  $2 \text{ mg l}^{-1}$  بود که با  $2/5 \text{ mg l}^{-1}$  تفاوت معنی‌داری نداشت. کمترین وزن تر مربوط به غلظت هورمونی  $3 \text{ mg l}^{-1}$  بود (جدول ۱ و شکل ۳). به‌طور مشابه، بیشترین وزن خشک گیاهچه در غلظت  $2 \text{ mg l}^{-1}$  حاصل شد که با غلظت‌های  $1/5 \text{ mg l}^{-1}$  و  $2/5$  تفاوت معنی‌داری نداشت. بیشترین درصد باززایی گیاهچه در غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ و کمترین آن در غلظت  $1/5$  مشاهده شد (درصد باززایی در همه تیمارها برای ۱۲ تکرار محاسبه شده است) (جدول ۱ و شکل ۱-۵).

جدول ۱- مقایسه شاخص‌های رشد و درصد باززایی گیاهچه از رویان نوروزک در غلظت‌های مختلف 2,4-D

غلظت 2,4-D (mg l <sup>-1</sup> )	طول بخش هوایی (mm)	طول ریشه (mm)	وزن تر کل (mg)	وزن خشک کل (mm)	تعداد برگ	درصد باززایی
۰	۲۰/۶±۲/۱	۱۲±۳/۲	۲/۶۲±۰/۴۲	۰/۱۲۷±۰/۰۰۵	۵/۷±۱/۰۹	۹۵/۵
۱	۲۵/۲±۴/۲	۱۷/۲±۴/۵	۲/۲۳±۰/۵۶	۰/۱۳۹±۰/۰۰۶	۵/۱±۰/۹۲	۹۲
۱/۵	۲۹/۲±۳/۲	۱۹/۲±۲/۳	۲/۴۴±۰/۴۳	۰/۱۴۶±۰/۰۰۸	۵/۵±۱/۰۵	۶۲
۲	۳۰/۸±۵/۱	۳۴/۹±۵/۶	۲/۹۴±۰/۶۷	۰/۱۷۲±۰/۰۰۳	۶/۱±۰/۸۵	۹۵/۸
۲/۵	۳۰/۶±۴/۸	۳۶/۲±۴/۵	۲/۸۱±۰/۸۷	۰/۱۷±۰/۰۰۵	۵/۹±۱/۰۷	۹۳
۳	۲۴±۲/۴	۳۸/۶±۳/۶	۲/۱۵±۰/۹۱	۰/۱۱±۰/۰۰۲	۴±۰/۸۷	۸۷/۵

داده‌ها، میانگین پنج تکرار می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه شاخص‌های رشد و درصد باززایی گیاهچه از رویان نوروزک در غلظت‌های مختلف کیتین

غلظت کیتین (mg l <sup>-1</sup> )	طول بخش هوایی (mm)	طول ریشه (mm)	وزن تر کل (mg)	وزن خشک کل (mm)	تعداد برگ	درصد باززایی
۰	۲۰/۶±۲/۱	۱۲±۳/۲	۲/۶۲±۰/۴۲	۰/۱۲۷±۰/۰۰۵	۵/۷±۱/۰۹	۹۵/۵
۰/۱	۲۱/۲±۲/۴	۷±۲/۳	۲/۰۴±۰/۵۴	۰/۱۱±۰/۰۰۶	۵/۶±۱/۰۶	۹۶
۰/۳	۲۱±۲/۳	۵±۲/۳	۱/۶۲±۰/۴۴	۰/۰۹۲±۰/۰۰۷	۶±۰/۸۵	۹۲/۲

داده‌ها میانگین پنج تکرار می‌باشد.

جدول ۳- مقایسه شاخص‌های رشد و درصد باززایی گیاهچه از رویان در ترکیب‌های مختلف 2,4-D و کیتین

نوع تیمار	طول بخش هوایی (mm)	طول ریشه (mm)	وزن تر کل (mg)	وزن خشک کل (mm)	تعداد برگ	درصد باززایی
۰	۲۰/۶±۲/۱	۱۲±۳/۲	۲/۶۲±۰/۴۲	۰/۱۲۷±۰/۰۰۵	۵/۷±۱/۰۹	۹۵/۵
۰/۱ mg l <sup>-1</sup> کیتین و 2,4-D۲	۶۴±۴/۵	۵۲±۵/۶	۴/۹±۰/۴۶	۰/۳۷۱±۰/۰۰۶	۹/۳±۰/۰۷	۹۶/۶
۰/۳ mg l <sup>-1</sup> کیتین و 2,4-D۲	۵۸±۵/۵	۳۲/۲±۴/۲	۳/۱۲±۰/۲۴	۰/۲۲۱±۰/۰۱۲	۷/۳±۰/۹۵	۵۷/۵
۰/۱ mg l <sup>-1</sup> کیتین و 2,4-D۲/۵	۵۲±۴/۳	۵۱±۵/۵	۳/۷۲±۰/۵۲	۰/۲۶۳±۰/۰۱۱	۸/۵±۰/۸۷	۹۲/۳
۰/۳ mg l <sup>-1</sup> کیتین و 2,4-D۲/۵	۵۹/۵±۳/۲	۳۸/۵±۷/۵	۳/۲۰±۰/۳۲	۰/۲۱۶±۰/۰۰۸	۷±۱/۰۲	۶۲

داده‌ها، میانگین پنج تکرار می‌باشد.

محیط با غلظت ۱/۵ mg l<sup>-1</sup>، تعدادی از رویانها در قسمت ریشه‌چه تولید کالوس کردند که بر روی آن ۲ تا ۳ عدد ریشه نوپدید به وجود آمد. در عده دیگری از رویانها که تولید گیاهچه‌های کامل نموده بودند، بخش هوایی باریک و دارای برگهای کوچک بود. در محیط کشت با غلظت

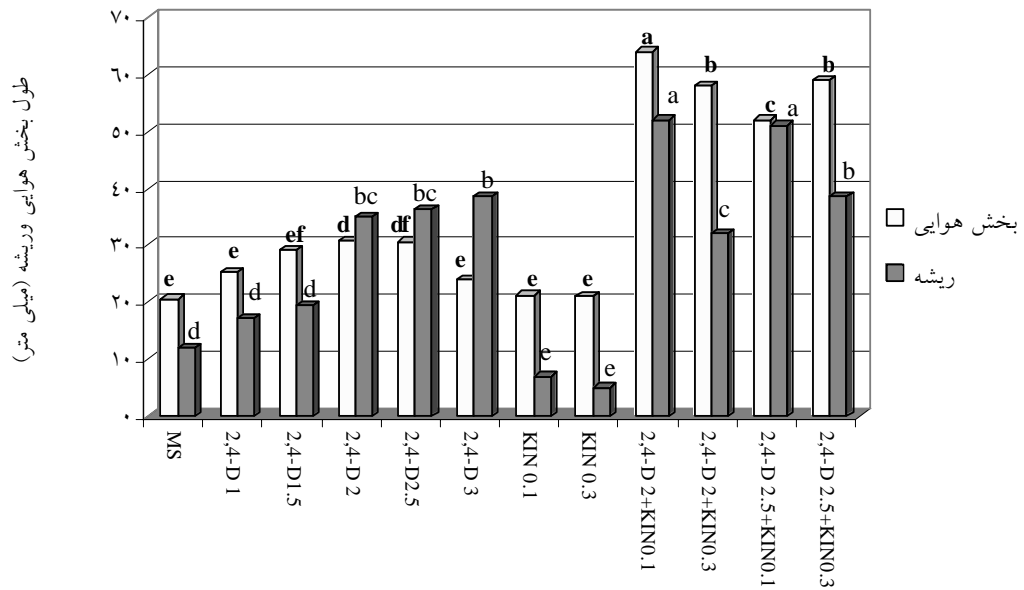
گیاهچه‌ها در محیط کشت بدون هورمون، حالت پیچ خورده داشت و دارای برگهای ضخیم شده و تعداد زیادی جوانه‌های جانبی کوچک روی ساقه بود (شکل ۶-ه). در محیط واجد ۱ mg l<sup>-1</sup> هورمون، گیاهچه دارای ساقه مشخص بدون پیچ خوردگی و برگهای کوچک بود. در

**د- تأثیر ترکیبهای مختلف 2,4-D و کیتین در کشت رویان**  
 بررسی رویانهای کشت شده پس از چهار هفته، بیانگر وقوع باززایی در تمام تیمارها بود. اندازه‌گیری طول بخش هوایی نشان داد که طول بخش هوایی در همه تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت. بیشترین طول بخش هوایی مربوط به تیمار  $2,4-D \ 2 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  و  $0.1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  کیتین بود که با همه تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد (شکل ۶- د). بیشترین طول ریشه نیز در همین تیمار بدست آمد که با  $2,4-D \ 2/5 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  و  $0.1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  کیتین تفاوت معنی‌داری نداشت، در حالی که نسبت به شاهد و دیگر تیمارها افزایش معنی‌داری نشان داد (جدول ۳ و شکل ۱). بیشترین تعداد برگ در تیمار  $2,4-D \ 2 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  و  $0.1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  کیتین شمارش شد که نسبت به  $2,4-D \ 2/5 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  و  $0.1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  کیتین تفاوت معنی‌داری نداشت، اما با شاهد و دیگر تیمارها تفاوت آن معنی‌دار بود (جدول ۳ و شکل ۲). بیشترین وزن تر و خشک مربوط به تیمار  $2,4-D \ 2 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  و  $0.1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  کیتین بود که تفاوت آن با شاهد و همه تیمارها معنی‌دار بود (جدول ۳ و شکل ۳ و ۴). بیشترین درصد باززایی گیاهچه در تیمار  $2,4-D \ 2 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  و  $0.1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  کیتین و کمترین درصد باززایی در تیمار  $2,4-D \ 2 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  و  $0.3 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  کیتین صورت گرفت (جدول ۳ و شکل ۵). نتایج بررسی‌های کیفی نشان داد در دو تیمار  $2,4-D \ 2 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  و  $0.3 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  کیتین برگها باریک و بلند و به سمت پایین خمیده و بدون پرز بودند. در حالی که در دو تیمار  $2,4-D \ 2 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  و  $0.1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  کیتین و  $2,4-D \ 2/5 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  و  $0.1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  کیتین گیاه حالت طبیعی داشته و برگها پرزدار بودند. در تیمار  $2,4-D \ 2 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  و  $0.1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  کیتین مقدار پرز برگها بیشتر بوده و ساقه دارای ۳ تا ۴ عدد جوانه جانبی بود.

هورمونی  $2 \text{ mg } \Gamma^{-1}$ ، گیاهچه‌ها دارای ساقه رشد یافته با برگها و ریشه طبیعی بودند. در حضور  $2/5 \text{ mg } \Gamma^{-1}$ ، گیاهچه‌ها تقریباً شبیه به گیاهچه رشد یافته در غلظت  $2 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  بودند، ولی از نظر طول بخش هوایی کوتاهتر و از نظر طول ریشه، بلندتر بود. بالاخره در حضور  $3 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  از هورمون گیاهچه‌ها ضعیف، دارای بخش هوایی کوتاه و برگهای باریکی بودند که باز نشده و در محل جوانه انتهایی به هم چسبیده بودند. طول ریشه در این گیاهچه‌ها نسبت به سایر غلظت‌ها بلندتر بود.

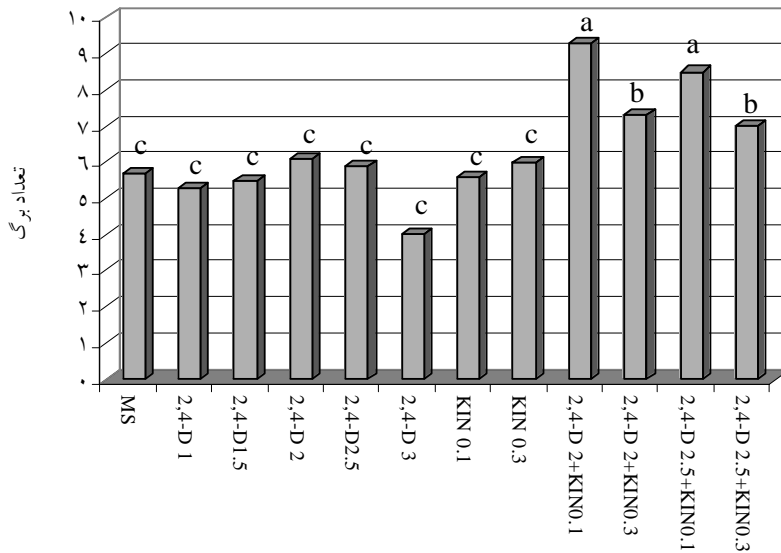
### ج- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتین در کشت رویان

در هر دو غلظت کیتین، چهار هفته بعد از کشت باززایی رویان انجام شد. تحلیل داده‌های حاصل از اندازه‌گیری طول بخش هوایی نشان داد که بیشترین طول بخش هوایی در غلظت  $0.1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  بدست آمد که با شاهد و غلظت  $0.3 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  تفاوت معنی‌داری نشان نداد. بیشترین طول ریشه نیز در همین غلظت بدست آمد که تفاوت معنی‌داری با غلظت  $0.3 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  نداشت. در حالی که به‌طور معنی‌داری کمتر از شاهد بود (جدول ۲ و شکل ۱). تعداد برگ در غلظت  $0.3 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  از این هورمون بیشتر از غلظت  $0.1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  بود که تفاوت آنها با هم و شاهد معنی‌دار نبود (جدول ۲ و شکل ۲). بیشترین وزن تر و خشک گیاهچه در غلظت  $0.1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  بدست آمد که تفاوت آنها با هم و شاهد معنی‌دار نبود (جدول ۲ و شکل ۳ و ۴). بیشترین درصد باززایی گیاهچه در غلظت  $0.1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  بدست آمد (جدول ۲ و شکل ۵). نتایج بررسی‌های کیفی نشان داد در هر دو غلظت این هورمون، گیاهچه‌ها به گیاهچه‌های محیط شاهد شبیه بودند. در غلظت  $0.3 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  تعداد جوانه‌های جانبی کوچک بیشتر از شاهد بود.



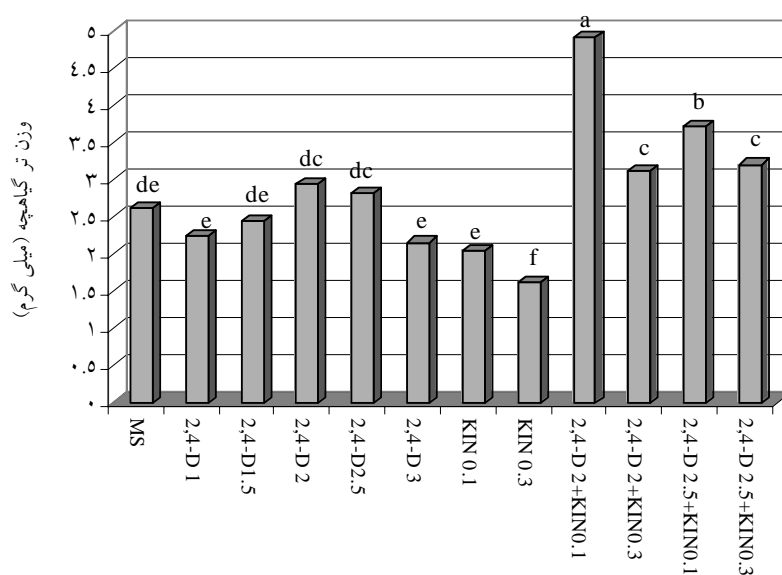
شکل ۱- مقایسه طول بخش هوایی و طول ریشه گیاهچه‌های باززایی شده در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D و کیتین و ترکیب‌های مختلف آنها

(ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند)



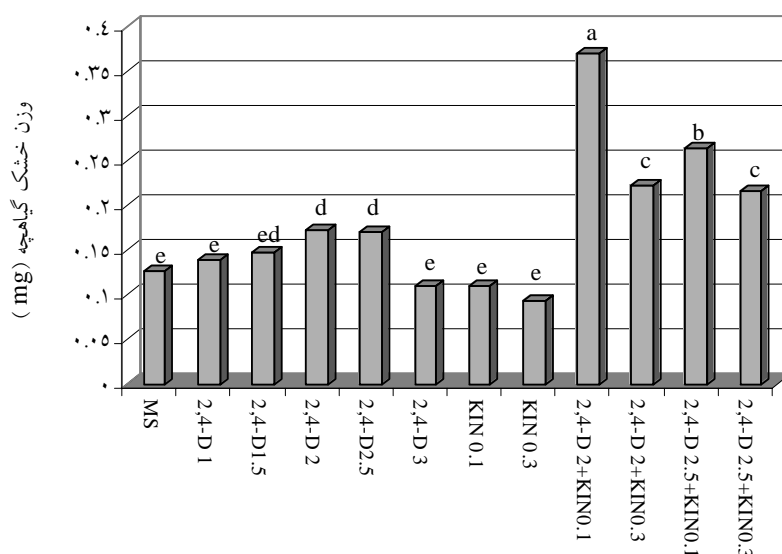
شکل ۲- مقایسه تعداد برگ در گیاهچه‌های باززایی شده در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D و کیتین و ترکیب‌های مختلف آنها

(ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند)



شکل ۳- مقایسه وزن تر گیاهچه‌های باززایی شده در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D و کیتین و ترکیب‌های مختلف آنها

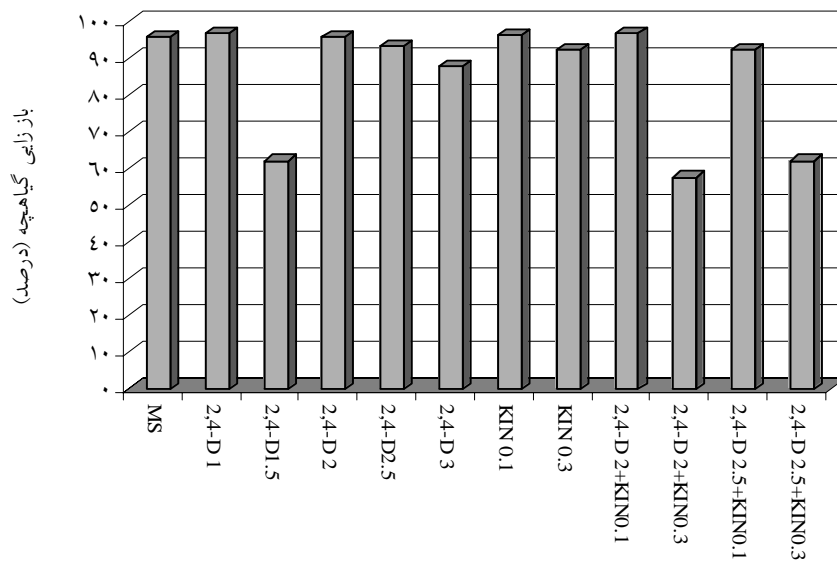
(ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند)



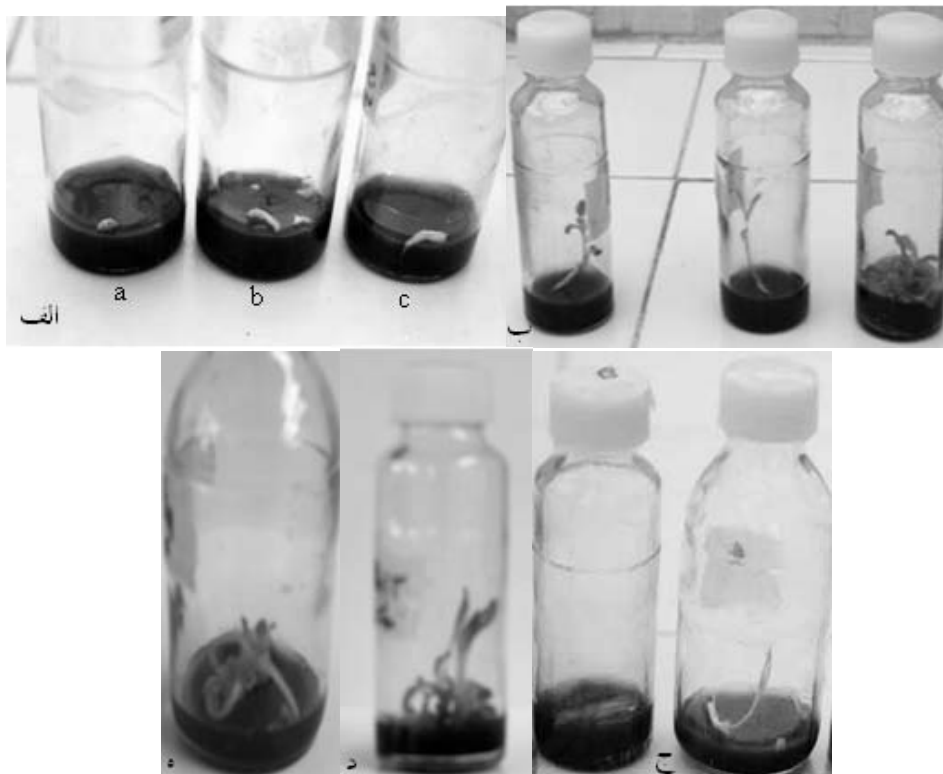
شکل ۴- مقایسه وزن خشک کل گیاه در گیاهچه‌های باززایی شده در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D و کیتین و ترکیب‌های مختلف آنها

(ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند)





شکل ۵- مقایسه درصد گیاهچه‌های باززایی شده در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D و کیتین و ترکیب‌های مختلف آنها



شکل ۶- مقایسه جداگشتهای مختلف رویانی، تأثیر شرایط نوری مختلف در کشت رویان و گیاهچه‌های باززایی شده از رویان

(الف- در ویال a عدم رشد رویان همراه نصف لپه پس از ۶۵ روز را نشان می‌دهد. در دو ویال b و c رشد رویانهای بدون لپه پس از ۴ روز نشان داده شده است. ب و ج- مقایسه تأثیر شرایط نوری در رشد رویان پس از دو هفته نشان داده شده است. رویانهای شکل ب یک هفته در تاریکی و بعد یک هفته در شرایط نوری بوده‌اند. در شکل ج رویان سمت چپ از ابتدا دو هفته در شرایط نوری بوده است و رویان سمت راست دو هفته در تاریکی قرار داشته است. د- گیاهچه باززایی شده از رویان در محیط 2,4-D ۲ mg l<sup>-1</sup> و ۱ mg l<sup>-1</sup> کیتین. ه- گیاهچه باززایی شده از رویان در محیط شاهد)

## بحث

قوه نامیه پایین و درصد جوانه‌زنی کم، در بذر گیاه نوروزک برای تکثیر این گیاه ارزشمند یک مشکل اساسی بشمار می‌آید. بررسیهای انجام شده توسط حداد خداپرست روی جوانه‌زنی این گیاه نشان داد که درصد جوانه‌زنی در این گیاه بسیار کم است و تنها در صورت شکستن پوسته دانه و در شرایط محیطی بهینه به ۲۵ تا ۴۵ درصد می‌رسد (حدادخداپرست و حسینی، ۱۳۷۲). از آنجا که در مورد کشت رویان در نوروزک و بطور کلی جنس مریم‌گلی هیچ گزارشی وجود ندارد، در این تحقیق برای اولین بار کشت رویان در شرایط درون شیشه انجام شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد، میانگین درصد جوانه‌زنی در رویانهای همراه یک لپه و یا قسمتی از آن در محیط کشت MS حدود ۲۰ درصد است که این نتیجه با تحقیق روی جوانه‌زنی همراه با شکستن دانه که لپه‌ها حضور داشتند، مطابقت دارد (حدادخداپرست و حسینی، ۱۳۷۲). حداکثر جوانه‌زنی (۹۶ درصد) در محیط کشت MS زمانی بدست آمد که لپه‌ها به‌طور کامل حذف شدند. بنابراین، به نظر می‌رسد که قسمت عمده مواد بازدارنده رشد رویان در لپه‌ها حضور دارند و میزان آن در پوسته ناچیز است. پوسته به خاطر عوامل فیزیکی و به علت داشتن مواد مغذی نظیر موسیلاژ سبب آلودگیهای قارچی و مانع از جوانه‌زنی می‌شود. این نتیجه بر خلاف تحقیقات قبلی در مورد جوانه‌زنی بذر نوروزک که تنها عامل بازدارنده جوانه‌زنی را پوسته دانه گزارش کرده‌اند، نقش بازدارنده لپه‌ها را آشکار می‌سازد (حسینی، ۱۳۷۴).

همچنین این تحقیق نشان داد عواملی که مانع جوانه‌زنی می‌شوند، در مرحله جوانه‌زنی اثر خود را اعمال می‌کنند و برای مرحله نمو گیاهچه عامل بازدارنده‌ای

وجود ندارد. زیرا به محض جدا شدن رویان از لپه‌ها و قرار گرفتن در محیط کشت شروع به رشد کرده و به اصطلاح جوانه‌زنی پیش‌رس دارد و به دنبال آن مرحله نمو گیاهچه به سرعت شروع می‌شود.

بهترین شرایط نوری در کشت رویان نوروزک، نگهداری رویانها به مدت یک هفته در تاریکی کامل بود. گیاهان بدست آمده از این رویانها از نظر رشد طولی ریشه و بخش هوایی نتایج بهتری را نسبت به شرایط نوری معمولی و شرایط دو هفته تاریکی نشان دادند.

باززایی گیاه طبیعی می‌تواند از کشت رویان در محیط کشت MS واجد 2,4-D به تنهایی و یا 2,4-D و کیتین به‌صورت توأم بدست آید. گزارشهای زیادی در مورد کشت رویان گیاهان مختلف در محیط MS همراه با تنظیم کننده‌های رشد اکسین و سیتوکینین وجود دارد. برای مثال، در بین چند محیط کشت مختلف، محیط کشت MS به همراه  $1 \text{ mg l}^{-1}$  اکسین و  $1 \text{ mg l}^{-1}$  کیتین به‌عنوان مناسبترین محیط برای کشت رویان در ۱۱ گونه مختلف مناطق گرمسیری بوده و استفاده از ۲ گرم در لیتر ذغال فعال در این محیط کشت و هورمونهای ذکر شده سبب نمو طبیعی رویان در همه این گیاهان شده است (Chin et al., 1998).

در این تحقیق با افزایش غلظت سیتوکینین، اگرچه درصد باززایی رویان کاهش قابل توجهی نداشت ولی شاخص‌های رشد در گیاهچه‌ها کاهش یافت. همچنین افزایش هورمون 2,4-D از ۱ به  $2 \text{ mg l}^{-1}$  سبب افزایش طول بخش هوایی در ریشه گردید. در غلظت  $3 \text{ mg l}^{-1}$  بر طول ریشه افزوده شد، اما این غلظت اثر بازدارندگی بر طول بخش هوایی داشت. بنابراین، دو غلظت ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر از 2,4-D به‌عنوان مناسبترین غلظت از این

محیط کشت با جذب این مواد زمینه رشد گیاه را تا یک ماه، بدون نیاز به واکشت فراهم ساخت. همچنین هورمون 2,4-D در محیط کشت به علت اثر بازدارندگی بر تولید مواد فنلی (Huang *et al.*, 2000)، باعث سبز بودن گیاه در مدت کشت گردید. در حالی که در محیط کشت MS بدون هورمون، بعد از یک ماه گیاه قهوه‌ای و خشک شد. در نهایت در محیط  $2,4-D \ 2 \text{ mg l}^{-1}$  و  $0/1$  کیتین گیاه بیش از ۱۳۰ روز به صورت کاملاً سبز توانست حیات خود را حفظ کند. پایداری گیاه در این مدت طولانی بدون نیاز به واکشت، نشانه سازگاری گیاه نسبت به خشکی می‌باشد.

تا آنجا که بررسی منابع نشان داده است نتایج حاضر، اولین گزارش از کشت رویان این گیاه در محیط‌های کشت مصنوعی می‌باشد و لازم است تحقیقات بیشتری در مورد استفاده از سایر تنظیم کننده‌های رشد، نوع و غلظت قند، pH بهینه و در نهایت امکان انتقال گیاه از محیط کشت مصنوعی به خاک و بعد شرایط طبیعی انجام شود.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از راهنمایی و همکاری سرکار خانم بشرویه، سرپرست محترم آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی و معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تشکر و قدردانی می‌شود.

### منابع مورد استفاده

- باغی، ن.، ۱۳۷۵. بررسی اثرات ضد میکروبی گیاه نوروبک. پایان نامه دکترای داروسازی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، صفحه ۳۴-۳۱.
- پیریک، ار.ال.ام. (باقری، ع.)، ۱۳۷۶. مبانی کشت بافت‌های گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحه ۱۸۷-۱۷۹.

هورمون تعیین شد و در ترکیب با کیتین مورد استفاده قرار گرفت. استفاده توأم از این دو هورمون در بیشتر موارد به‌طور معنی‌داری سبب افزایش طول بخش هوایی و ریشه نسبت به شاهد و غلظت‌های مختلف 2,4-D و کیتین به تنهایی گردید. علاوه بر این، حضور هر یک از این هورمون‌ها به تنهایی در محیط تأثیری در افزایش تعداد برگ‌ها نداشتند؛ در صورتی که استفاده از ترکیب‌های مختلف این دو هورمون در تیمار  $2,4-D \ 2 \text{ mg l}^{-1}$  و  $0/1 \text{ mg l}^{-1}$  کیتین به دلیل افزودن بر تعداد جوانه‌های جانبی، بطور معنی‌داری سبب افزایش تعداد برگ در گیاهچه‌ها گردید. بنابراین با توجه به این موارد، وزن تر و خشک گیاهچه‌ها نیز افزایش یافت. این نتایج با نتایج Lippman و Lippmann (۲۰۰۴) در مورد کشت رویان سویا مطابقت دارد. براساس تحقیق وی افزودن اکسین در حد متعادل و سیتوکینین در غلظت‌های کم به محیط کشت سبب تحریک رشد رویان و نمو گیاهچه‌های طبیعی می‌شوند.

حضور توأم این دو هورمون در محیط کشت رویان، اگرچه در بیشتر موارد سبب بهبود شاخص‌های رشد در گیاهچه گردید ولی در بیشتر موارد به جز تیمار  $2 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D و  $0/1 \text{ mg l}^{-1}$  کیتین سبب کاهش شدید درصد باززایی شد. از آنجا که تیمار  $2,4-D \ 2 \text{ mg l}^{-1}$  و  $0/1 \text{ mg l}^{-1}$  کیتین از نظر شاخص‌های رشد، درصد باززایی و همچنین خصوصیات کیفی نظیر طبیعی و پرزدار بودن برگ‌ها نسبت به تیمارهای دیگر برتری داشت، به نظر می‌رسد این تیمار برای باززایی گیاهچه از رویان در گیاه نوروبک مناسبتر است.

از آنجا که وجود ترکیبات فنلی در ریشه و برگ گیاه نوروبک اثبات شده است (Khodaparast *et al.*, 2006) و Hadad و فرهوش، (۱۳۸۲)، استفاده از ذغال فعال در

ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۷۵ صفحه.

- Chin, H.F., Krishnapillay, B. and Alang, Z.C., 1998. Media for embryo culture of some tropical recalcitrant species. *Pertanika*, 11(3): 357-363.
- Hadad Khodaparast, M.H., Haghdoost, A., Elhami-Rad, A.H., Movahhed, G. and Karazhiyan, H., 2006. Antioxidant activity and thermal Properties of *Salvia leriifolia* (Norozak) root extract. Proceedings of the international conference on Innovations in Food and Bioprocess Technologies, 12-14 December 2006, AIT, Pathumthani, Thailand. Pages: 378.
- Hosseinzadeh, H. and Yavary, M., 1999. Anti-inflammatory effect of *Salvia leriifolia* Benth leaf extract in mice and rat. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 9(2): 60-61.
- Hosseinzadeh, H. and Lary, P., 2000. The effect of *Salvia leriifolia* Benth root extracts on morphine dependence in mice. *Phytotherapy Research*, 14(5): 384-387.
- Hosseinzadeh, H., Haddad Khodaparast, M.H. and Hosseini, E., 2000. Anti-ulcer effect of *Salvia leriifolia* Benth leaf extract in mice. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 10(2): 63-64.
- Huang, L., Liu, D., Hu, Z., 2000. Effects of phytohormones on growth and content of depsides in *Salvia miltiorrhiza* suspension cells In vitro *Cellular and Developmental Biology* ;23(1):1-4.
- Lippmann, B., Lippmann, G., 2004. Soybean embryo culture: factors influencing plant recovery from isolated embryos. *Plant cell tissue and organ culture*, 32(1): 83-90.
- Rechinger, K.H., 1982. *Flora Iranica*. N.150, *Academische Druk.u.Verlag sustalt Gratz*.page 439.
- Sadeghnia, H.R., Nassiri Asl, M., Haddad Khodaparast, M.H. and Hosseinzadeh, H., 2003. The effect of *Salvia leriifolia* Benth root extracts on lipid peroxidation during global ischemic-reperfusion in rats. *Medicinal Plants*, 7: 19-28.

- جبارزاده، م.، ۱۳۷۸. بررسی خواص ضد میکروبی عصاره‌های ریشه و دانه گیاه نوروزک. پایان‌نامه دکترای داروسازی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، صفحه ۵۶-۵۴.
- حداد خدایپرست، م.ح.، ۱۳۷۴. بررسی ترکیبات شیمیایی دانه نوروزک. مجله علمی پژوهشی علوم و صنایع کشاورزی. ۹: ۵۶-۴۲.
- حدادخدایپرست، م.ح. و حسینی، م.، ۱۳۷۲. اثر عوامل محیطی بر جوانه‌زنی گیاه نوروزک در شرایط آزمایشگاهی. مجله پژوهش و سازندگی، سال ۱۰، ۳۷: ۴۵-۴۲.
- حسینی، م.، ۱۳۷۴. تکنولوژی تولید انبوه گیاه نوروزک. مجله پژوهش و سازندگی، ۱۲ (۴۲): ۵۴-۵۰.
- صفوی، ح.، ۱۳۶۸. فلور خراسان (فهرست مستخرج از فلور ایرانیکا) جلد اول. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۲۵ صفحه.
- طباطبائی یزدی، ف.، ۱۳۷۴. بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره برگ گیاه نوروزک و شناسایی فیتوشیمیایی آن. پایان‌نامه درجه کارشناسی ارشد رشته شیمی، صفحه ۷۸-۷۵.
- فرهوش، ر.، ۱۳۸۲. استخراج، تخلیص و شناسایی فراکسیون عمده آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه نوروزک و بررسی خصوصیات آن. پایان‌نامه دکترای، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۷۲ صفحه.
- فیله‌کش، ا.، ۱۳۸۲. بررسی آت اکولوژی گیاه مرتعی *salvia leriifolia* در سبزوار. خلاصه مقالات اولین همایش توسعه پایدار گیاهان دارویی. صفحه، ۳۳.
- مدرس، م.، ۱۳۸۶. مطالعه رویداد شناسی (phenology) و برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth). پایان‌نامه درجه کارشناسی

## Propagation of *Salvia leriifolia* by embryo culture

M. Modarres<sup>1</sup>, P. Abrishamchi<sup>1</sup>, H. Ejtehadi<sup>1</sup> and A. Ramezani<sup>1</sup>

1- Ferdowsi University of Mashhad, E-meil:m\_modarres70@yahoo.com

### Abstract

*Salvia leriifolia* (Lamiaceae) is an endemic plant to Khorasan and Semnan provinces. In recent years, the different pharmaceutical properties of the seeds, leaves and roots of the plant, such as antimicrobial, antifungal hypoglycemic, antispasmodic and anti-inflammatory were evaluated. Since germination of the seeds is restricted in nature, it is important to consider micropropagation. The aim of this study to examine the embryo culture in micropropagation of *Salvia leriifolia*. For this purpose, the effects of different concentrations of plant growth regulators on embryo culture were investigated. Different concentrations of 2,4-D (0, 1, 1/5, 2, 2/5 and 3 mg l<sup>-1</sup>), kinetin (0, 0/1 and 0/3 mg l<sup>-1</sup>) and their combination were applied in MS medium. The embryos were cultured and incubated at 25°C in dark for 1 week and then transferred to light for 3 weeks. According to the results MS medium supplemented with 2 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D and 0.1 mg l<sup>-1</sup> kin had a significant effect on growth of embryos and plant regeneration.

**Key words:** Embryo culture, propagation and *Salvia leriifolia*